台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(4):340–350 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06204.04

利用塑酯薄膜法觀察甜瓜白粉病菌分生孢子的發芽與菌絲生長

黃晉興[1,*] 蘇俊峰[1]

摘要

黃晉興、蘇俊峰。2013。利用塑酯薄膜法觀察甜瓜白粉病菌分生孢子的發芽與菌絲生長。台灣農業研究 62(4):340–350。

利用水瓊脂、醋酸纖維 (acetyl cellulose) 玻片與塑酯薄膜法 (plastic membrane method) 於顯微鏡下，皆可觀察到甜瓜白粉病菌 (*Podosphaera xanthii*) 分生孢子發芽，但是僅利用塑酯薄膜法才可觀察到白粉病菌的菌絲生長。將甜瓜白粉病菌分生孢子接種在葉圓片 (leaf disc) 上培養 48 h 後，利用塑酯薄膜法可觀察得到白粉病菌最適發芽溫度介於 20–28℃，發芽率介於 40.7–48.3% 之間，而最適菌絲生長溫度介於 20–26℃之間，菌絲產生率介於 30.7–33.1% 之間，其菌絲生長長度則介於 179.0–228.0 μm 之間。當甜瓜白粉病菌 (*P. xanthii race* 1) 分生孢子接種於感病甜瓜品種 'Iran H' 與 'Védrantais' 等之葉圓片 48 h 後，分生孢子發芽率、菌絲產生率與菌絲生長長度分別為 51.3–58.8%、41.3–53.5% 與 196.0–212.4 μm，皆高於接種於抗病甜瓜品種 'PMR-45'、'PI-124112' 與 'MR-1'，其分別為 12.5–15.4%、0–0.8% 與 0–82.1 μm，此結果與直接將 Px-001 供試菌株分生孢子接種於盆栽植株所得結果相同。又將 2 個 race 1 菌株 (Px-001 與 Px-274) 與 2 個 race 5 菌株 (Px-359 與 Px-3604) 分別接種在 'Iran H'、'PMR-45' 與 'MR-1' 品種葉圓片上，供試菌株在感病甜瓜品種的菌絲產生率在 29.0–54.0% 之間，而在抗病甜瓜品種的菌絲產生率在 0–6.8% 之間，具有顯著差異 ($P < 0.05$)。由結果顯示，將甜瓜白粉病菌分生孢子接種在甜瓜葉圓片上，再以塑酯薄膜法檢測分生孢子的菌絲產生率可做為甜瓜品種對白粉病菌之抗感性測定。

關鍵詞：塑酯薄膜法、甜瓜、白粉病菌、孢子發芽、菌絲生長。

前言

白粉病 (powdery mildew) 是甜瓜重要之地上部病害之一，此病害主要影響作物光合作用、降低瓜果風味、品質與產量 (Sitterly 1978; Tsay & Tung 1994; Zitter 1996)。引起該病害之病原菌主要包括 *Podosphaera xanthii* (Castag.) Braun & N. Shish [syn. *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.) Poll; S. *fusca* (Fr.) Blumer emend. Braun]、*Golovinomyces cichoracearum* (D. C.) Huleta (syn. *Erysiphe cichoracearum* DC ex. Mecat) 及 *Leveillula taurica* (Lev.) Arnaud (Pitrat *et al*. 1998; Braun *et al*. 2001; Jahn *et al*. 2002)。其中以 *P. xanthii* 較爲常見，一般多發生於熱帶、亞熱帶地區以及溫室栽培園內，而 *G. cichoracearum* 多發生於溫帶地區，*L. taurica* 則較少見 (Křístková *et al*. 2007)。在台灣，目前僅有 *P. xanthii* 被鑑定爲甜瓜白粉病的病原菌 (Tsay & Tung 1994; Huang *et al*. 2002)。

甜瓜白粉病菌 (*P. xanthii*) 有許多生理小種 (races) 的區分 (Mohamed *et al*. 1995; Pitrat *et al*. 1998; McCreight 2006)，在台灣目前有 race 1 與 race 5 等 2 個生理小種，race 1 可感染甜瓜鑑別品種 'Iran H' 與 'Védrantais'，並

投稿日期：2013 年 5 月 3 日；接受日期：2013 年 9 月 6 日。
* 通訊作者：jhhuang@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。

出現病徵，但不會在 ‘PMR-45’、‘Edisto-47’ 與 ‘WMR-29’ 等鑑別品種造成病徵，而 race 5 可在甜瓜鑑別品種 ‘Iran H’、‘ Védrantais’、‘PMR-45’、‘Edisto-47’ 與 ‘WMR-29’ 造成病徵，而甜瓜鑑別品種 ‘PI-124112’ 與 ‘MR-1’ 對上述 2 個生理小種皆呈抗病反應 (Mohamed *et al*. 1995; Pitrat *et al*. 1998; McCreight 2006; Huang & Wang 2007)。上述這些甜瓜鑑別品種對白粉病菌的抗感病反應，皆可利用葉圓片接種法或全株接種法判定 (Cohen 1993; Huang *et al*. 2002)。

甜瓜白粉病菌爲一種表生之絕對寄生性真菌，只能利用寄主活體的養分，無法於人工培養基生長與繁殖。其分生孢子於寄主植物表面發芽，爾後產生附著器 (appresoria)、侵入釘 (infection peg)，侵入植物組織內以吸器 (haustoria) 吸取葉細胞的養分，使菌絲得以於葉表蔓延、生長形成菌落，產生分生孢子並進行傳播 (Sitterly 1978)。若要觀察孢子於寄主作物葉表面的行爲，不易以解剖顯微鏡直接觀察，需先將葉片以化學藥劑透化與染色，才能在光學顯微鏡 (Kuzuya 2006; Romero *et al*. 2008) 或掃描式電子顯微鏡下觀察 (Romero *et al*. 2008)。此過程中卻不易將未發芽的孢子固定在葉表上，另外此過程繁瑣，不易進行大量標本的觀察；若將孢子吹佈於水瓊脂培養基或醋酸纖維玻片 (acetyl cellulose) 上，雖可觀察得到所有接種的孢子，且部分孢子會有發芽管產生，但是發芽後的孢子卻無法繼續生長產生菌絲 (Tsay & Tung 1994)。爲了觀察孢子發芽後於葉表面的生態行爲，必須研發更適用的方法。

可撕噴霧式薄膜 (airbrush shrink wrap) 其主要成分爲醋酸丁酯 (butyl acetate) 與聚氯乙稀 (poly vinyl chloride; PVC)，爲一種液態塑膠產物。以噴霧方式將之噴佈於物品表面，待乾燥後可形成一層薄而透明且具有彈性之保護膜，達到防塵的效果。因此，本研究擬利用可撕噴霧式薄膜液體，將其噴佈於甜瓜葉片上，嘗試將葉表面上的白粉病菌分生孢子黏著，將薄膜撕下後置於顯微鏡下染色，觀察孢子於葉表面發芽與菌絲生長，該方法稱爲塑酯薄膜法 (plastic membrane method)。

材料與方法

供試植物與葉圓片之製備

將 ‘Iran H’、‘Védrantais’、‘PMR-45’、‘PI-414723’ 與 ‘MR-1’ 等 5 個甜瓜品種，種植於盛有泥炭土 (Bio-Mix Potting Substrate, Netherlands) 之 5 吋塑膠盆內，置於 28℃/22℃ (day/night) 12 h 光照之生長箱中栽培。待供試植物苗齡 3–4 wk 時，取苗齡 3 wk 植株上半部第 3、4 葉片或苗齡 4 wk 第 4–7 葉之新展開葉片，以自來水洗淨，再經消毒水 (於 200 mL 1% 次氯酸鈉加入數滴 Tween-20 界面活性劑攪拌均勻) 表面消毒 1–2 min 後，以無菌水漂洗 3 次，再以乾淨衛生紙吸乾葉表面之游離水。已經高溫滅菌後之金屬圓柱打孔器切取直徑 15 mm 葉圓片 (面積 1.77 cm^2)，置於裝有二張濾紙之塑膠培養皿內 (直徑 6 或 9 cm)，該培養皿內再添加適量含有 50 $\mu L\ L^{-1}$ tetracyclin 之 M-solution (水溶液含 10,000 $\mu L\ L^{-1}$ 的 mannitol 與 30 $\mu L\ L^{-1}$ 的 benzimidazole)，使濾紙完全濕潤，並有游離水產生，用以維持葉圓片的活力 (Epinet *et al*. 1993; Bardin *et al*. 1997; Huang *et al*. 2002)。

甜瓜白粉病菌接種源準備與接種方法

本文使用之供試菌 (*P. xanthii*) 繁殖於葉片上，經由乾燥後保存於液態氮中 (Huang *et al*. 2009)， 菌株計有 Px-001、Px-274、Px-359 與 Px-360，皆分離自台中市霧峰區發生白粉病之甜瓜葉片，前 2 個菌株爲 race 1，後 2 個菌株爲 race 5。將供試菌株移植於上述葉圓片培養皿內 (甜瓜品種爲 ‘Iran H’)，於 12 h 光照的 20℃定溫箱中培養 12–16 d，使白粉病菌長滿整個葉圓片作爲接種源。接種白粉病菌時，於中空塑膠圓椎管 (底管口直徑 12 cm，上管口直徑 4 cm，高 30 cm) 底管口處放置一含葉圓片之培養皿，於上管口處以氣流將供試菌株分生孢子吹落於置於底管口處的供試葉圓片，亦或可接種於苗齡 3 wk 的栽培盆甜瓜幼苗葉片上。接種後，使被接種的葉圓片上達 100–300 spores cm^{-2} (Huang *et al*. 2002)， 培

養皿加蓋後，並以石臘膜密封，並移置於每日 12 h 光照的 24℃/18℃ (day/night) 定溫箱中，10 d 後記錄發病面積佔葉片之百分比，視為發病度 (disease severity)。

利用水瓊脂、醋酸纖維玻片與塑酯薄膜檢測甜瓜白粉病菌孢子發芽與菌絲生長

將醋酸纖維 (acetyl cellulose, Sigma) 溶解於丙酮 (W：W = 1：100) 再塗抹於載玻片上，以製成醋酸纖維玻片，放置在裝有濕潤濾紙的 9 cm 培養皿中；又配置 2% 水瓊脂培養基 [water agar (WA), Difco, USA] 與以 'Iran H' 品種甜瓜植株製備葉圓片。利用上述中空塑膠圓椎管接種方式，將供試菌株 (Px-001) 的分生孢子，分別接種於醋酸纖維玻片、2% WA 與葉圓片上 (100–300 spores cm^{-2})，培養皿以石臘膜密封，每處理 4 重複，並移置於每日 12 h 光照的 24℃ 生長箱中培養 48 h。接種後的 2% WA 與醋酸纖維玻片直接於光學顯微鏡下觀察孢子發芽與菌絲生長的情形。而以葉圓片接種法處理之葉圓片，以可撕噴霧式塑酯薄膜噴劑 (可撕噴霧式保潔膜，巧幫手公司，台灣) 噴佈葉圓片表面，待蔭乾後撕下薄膜，以酸性品紅染劑 (acid-fusion) 進行染色，於光學顯微鏡下觀察孢子發芽與菌絲生長的情形 (圖 1)。由於分生孢子產生發芽管後，並不一定

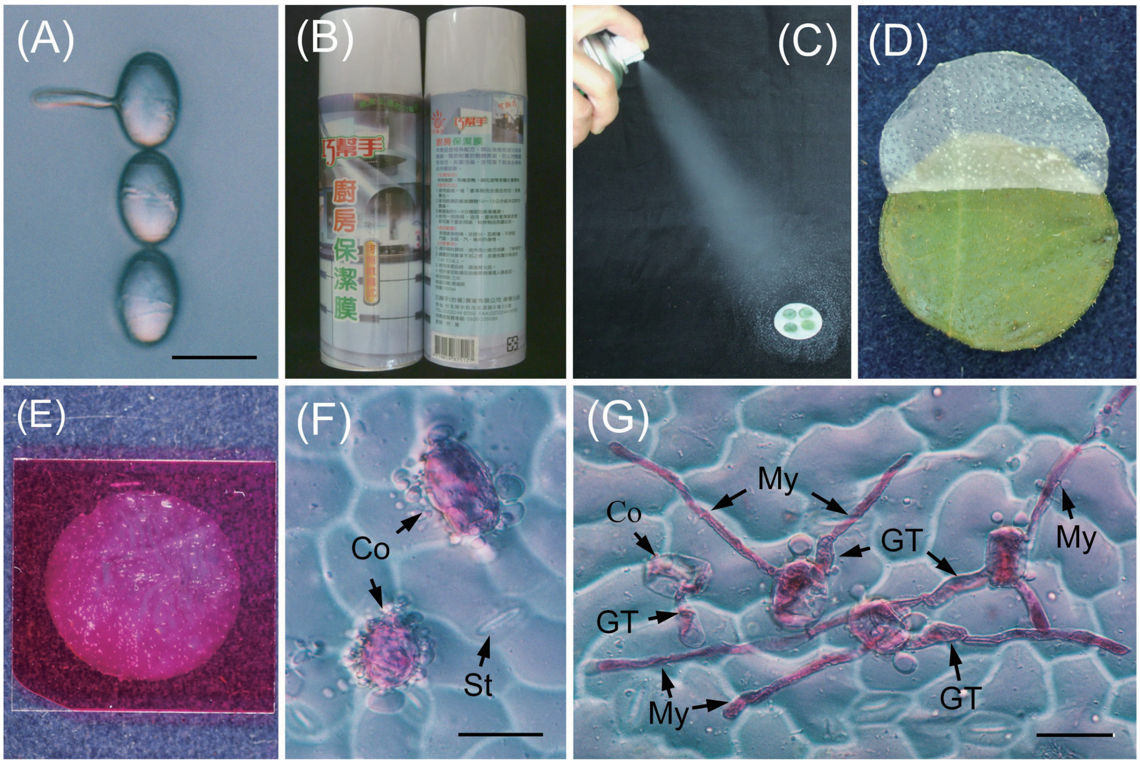

圖 1. 白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 分生孢子之發芽與菌絲生長觀察。分生孢子於水瓊脂發芽 (A)；利用液態塑酯 (B) 噴霧於附著有甜瓜白粉病菌孢子的甜瓜葉圓片上 (C)，撕下塑酯薄膜 (D) 經過酸性品紅染劑染色後 (E)，於顯微鏡下可觀察黏附於塑酯薄膜的白粉病菌分生孢子的發芽與菌絲生長 (F、G)。Co：分生孢子；ST：氣孔；GT：發芽管；My：菌絲。

Fig. 1. Conidial germination and mycelial growth *Podosphaera xanthii*. Germination of conidia on water agar (A). Liquid plastic resin (B) spraying on a leaf disc of melon inoculated with conidia of *P. xanthii* (C) and the plastic membrane was removed (D) and stained with acid fusion (E). Conidia, germinated conidia and mycelia from germinated conidia which adhered on plastic membrane (F, G) were examined under compound microscope. Co: conidia; St: Stomata; GT: germ tube; My: mycelia. Bar = 25 μm.

會產生菌絲 (圖 1G)，故觀察時，每重複觀察 100 個孢子，並計算發芽率 (germination rate, %) 與菌絲產生率 (hyphal development rate, %)，再量取最長菌絲長度，每重複量取 10–20 條菌絲。

溫度對甜瓜白粉病菌分生孢子發芽與菌絲生長的影響

以 'Iran H' 品種製備葉圓片接種供試菌株 Px-001 (100–200 spores cm^{-2})，接種後移置於 4、8、12、16、20、24、26、28、30、32 與 36℃的定溫箱中 (光照 12 h d^{-1})，分別於接種後第 0、3、6、12、24 與 48 h，於葉圓片上噴佈可撕噴霧式薄膜，待蔭乾後撕下薄膜，經酸性品紅染劑染色，於光學顯微鏡下觀察、計算孢子發芽率與菌絲產生率，並逢機取 10 顆有已長出菌絲的孢子，量取菌絲長度，每處理 4 皿 (重複)，每皿 4 片葉圓片。

品種對甜瓜白粉病菌分生孢子發芽與菌絲生長的影響

以 'Iran H'、'Védrantais'、'PMR-45'、'PI-414112' 與 'MR-1' 等 5 個甜瓜品種製備葉圓片，接種供試菌株 Px-001 達 100–200 spores cm^{-2}，供試葉圓片於 24℃生長箱中培養 48 h。另一處理，則將上述品種種植在盛有泥炭土之 5 吋塑膠盆中，待株齡 3 wk 時，將供試菌株 Px-001 的分生孢子接種於的第 3–4 片展開葉上。接種後，於 24℃生長箱中培養 48 h (光照 12 h d^{-1})，以打孔器切取下直徑 15 mm 葉圓片。於試驗所得之葉圓片上噴佈可撕噴霧式薄膜，待蔭乾後撕下薄膜，經以酸性品紅染劑染色，於光學顯微鏡下觀察、計算孢子發芽率與菌絲產生率，並逢機取 10 顆已長出菌絲的孢子，量取菌絲長度，每處理 4 皿 (重複) ，每皿 4 片葉圓片。又於接種後第 10 d，計算發病度。

不同白粉病菌與甜瓜品種對分生孢子發芽與菌絲生長的影響

以 'Iran H'、'PMR-45' 與 'MR-1' 等 3 個甜瓜品種製備葉圓片，接種甜瓜白粉病菌 *P. xanthii* 供試菌株 Px-001 (race 1)、Px-274 (race 1)、Px-359 (race 5) 與 Px-360 (race 5) 達 100–200 spores cm^{-2}。供試葉圓片於 24℃生長箱中培養 48 h 後，於葉圓片上噴佈可撕噴霧式薄膜，待蔭乾後撕下薄膜，經以酸性品紅染劑染色，於光學顯微鏡下觀察、計算孢子發芽率與菌絲產生率，並逢機取 10 顆已長出菌絲的孢子，量取菌絲長度，每處理 4 皿 (重複)，每皿 4 片葉圓片。又於接種後第 10 d，於解剖顯微鏡下將白粉菌產生孢子佔葉圓片之面積比率視為發病度，計算各處理之發病度。

結果

塑酯薄膜法之孢子回收率

將接種白粉病菌孢子的甜瓜葉圓片 48 h 後，以塑酯薄膜法黏附孢子與菌絲 (圖 1)，計算 4 次接種於葉圓片的孢子量分別為 147、190、233 與 251 spores cm^{-2}，再計算經塑酯薄膜黏附的孢子量分別為 150、186、226 與 238 spores cm^{-2}，則以塑酯薄膜可回收接種的分生孢子達 97.9%。

利用水瓊脂、醋酸纖維玻片與塑酯薄膜觀察白粉病菌孢子發芽與菌絲生長

將接種白粉病菌孢子的 2% WA 培養基與醋酸纖維玻片 48 h 後，直接於光學顯微鏡下可直接觀察到白粉病菌的孢子發芽 (圖 1A)，但是無法觀察到有菌絲生長。而將接種白粉病菌的葉圓片表面噴佈可撕噴霧式塑酯薄膜 (圖 1B、1C)，待蔭乾後撕下附著孢子的薄膜 (圖 1D)，再以酸性品紅染劑染色 (圖 1E) 後，於光學顯微鏡直接鏡檢白粉病孢子 (圖 1F)，並可觀察到已發芽的孢子與菌絲生長 (圖 1G)。供試菌株 Px-001 分生孢子接種於水瓊脂、醋酸纖維玻片與葉圓片 48 h 後，其發芽率分別為 5.6、47.6 與 49.2%，而在葉圓片上的已發芽孢子有菌絲生長出，菌絲產生率為 41.2%，其菌絲長度為 187.4 μm (表 1)。

溫度對白粉病菌孢子發芽與菌絲生長的影響

以 'Iran H' 品種製備葉圓片接種供試菌株 Px-001，置於 4–36℃定溫箱中，3 h 後，16–32℃處理者已經開始有少數分生孢子發芽。孢

表 1. 白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 之分生孢子於水瓊脂、醋酸纖維玻片、Iran H 甜瓜葉圓片上的發芽與菌絲生長。

Table 1. Conidial germination and mycelial growth of *Podosphaera xanthii* on 2% water agar, 2% cellulose acetate and leaf discs of the melon variety Iran H[z].

Substrate	Conidial germination (%)[y]	Hyphal development rate (%)[x]	Hyphal length (μm 48 h^{-1})[w]
2% water agar	5.6 b[v]	0.0 b	0.0 b
2% cellulose acetate	47.6 a	0.0 b	0.0 b
Leaf discs of Iran H	49.2 a	41.2 a	187.4 a

[z] The data was recorded 48 h after inoculation at 24℃.
[y] Percentage of conidia produced germ tube.
[x] Percentage of germinated conidia developed hyphae from germ tubes.
[w] Mean radial length of mycelia from germ tubes.
[v] Means within each column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ according to the Fisher's least significance difference (LSD) test.

子發芽率隨處理時間增加而增加，在處理後 48 h，以 20、24、26 與 28℃處理的發芽率較高，分別爲 40.7、48.3、47.8 與 41.3%。隨溫度降低，發芽率亦隨之減少，16℃以下處理，孢子發芽率皆低於 30%。同樣的，隨溫度增加，發芽率亦隨之減少，30℃以上處理的發芽率皆低於 17%，36℃則完全不發芽 (圖 2A)。而已發芽的分生孢子，於接種處理 12 h 後已可觀察到有菌絲生長出，到接種後 48 h 的菌絲產生率在 20、24 與 26℃之處理者爲較高，分別爲 33.1、31.6 與 30.7%；12、16 與 28℃之處理次之，分別爲 9.8、19.9 與 15.7%；30℃之處理爲 3.9%，而 4、8、32 與 36℃處理者，在測試時間內皆無菌絲生長出 (圖 2B)。在量取接種後 48 h 的菌絲生長長度，20、24 與 26℃處理者最高，分別爲 179.0、228.0 與 180.4 μm；28 與 30℃之處理次之，分別爲 150.0 與 103.7 μm；12 與 16℃之處理則分別爲 47.8 與 89.3 μm；4 與 8℃在 48 h 則不見菌絲生長 (圖 2C)。

品種對甜瓜白粉病菌分生孢子發芽與菌絲生長的影響

以 ‘Iran H’、‘Védrantais’、‘PMR-45’、‘PI-414112’ 與 ‘MR-1’ 等 5 個甜瓜品種製備葉圓片，接種供試菌株 Px-001。接種 48 h 後，供試菌株的分生孢子在 ‘Iran H’ 與 ‘Védrantais’ 葉圓片上發芽率分別爲 55.1% 與 51.3%，兩者無顯著差異 ($P < 0.05$)，但是在 ‘PMR-45’、‘PI-414112’ 與 ‘MR-1’ 葉圓片上的發芽率介於 12.5–15.4% 之間，三者間無顯著差異 ($P < 0.05$)，但是其與 ‘Iran H’ 與 ‘Védrantais’ 所得之發芽率具有顯著差異 ($P < 0.05$)。而供試菌株在 ‘Iran H’ 與 ‘Védrantais’ 葉圓片的菌絲產生率分別爲 41.3% 與 44.3%，但在 ‘PMR-45’、‘PI-414112’ 與 ‘MR-1’ 葉圓片上卻僅有 0–0.8%。已發芽的分生孢子在 ‘Iran H’ 與 ‘Védrantais’ 葉圓片的菌絲生長長度分別爲 196.0 μm 與 204.5 μm，但在 ‘PMR-45’、‘PI-124112’ 與 ‘MR-1’ 葉圓片上分別爲 67.0、82.1 與 0 μm。進一步計算發病度，在 ‘Iran H’ 與 ‘Védrantais’ 葉圓片上已達的 100%，但在 ‘PMR-45’、‘PI-414112’ 與 ‘MR-1’ 葉圓片上則皆爲 0 (表 2)。

另一處理，則將 ‘Iran H’、‘Védrantais’、‘PMR-45’、‘PI-414112’ 與 ‘MR-1’ 等 5 個甜瓜品種種植在盛有泥炭土之 5 吋塑膠盆中，待株齡 3 wk 時，再接種供試菌株 Px-001 的分生孢子。結果在接種 48 h 後，供試菌株分生孢子在 ‘Iran H’ 與 ‘Védrantais’ 葉片上的發芽率分別爲 56.3% 與 47.6%，兩者無顯著差異 ($P < 0.05$)，而在 ‘PMR-45’、‘PI-414112’ 與 ‘MR-1’ 處理者的發芽率介於 21.3–29.4%，雖然三個品種處理間無顯著差異 ($P < 0.05$)，但與 ‘Iran H’ 與 ‘Védrantais’ 處理的發芽率具有顯著差異 ($P < 0.05$)。菌絲產生率在 ‘Iran H’ 與 ‘Védrantais’ 處理分別爲 50.8% 與 43.8%，與 ‘PMR-45’、‘PI-414112’ 與 ‘MR-1’ 處理間具有顯著差

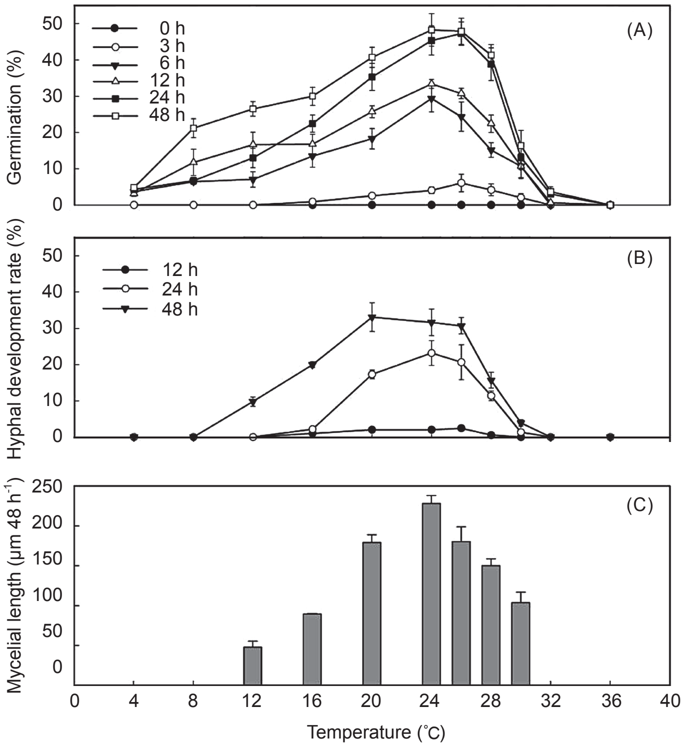

圖 2. 溫度對白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 分生孢子於甜瓜 Iran H 葉圓片上的發芽 (A)、菌絲產生 (B) 與菌絲長度 (C) 之影響。

Fig 2. Effect of temperature on germination of conidia (A), production of hyphae from germ tubes (B) and length of mycelia from gerinated conidia (C) of *Podosphaera xanthii* inoculated on leaf discs of the melon variety Iran H. Data were collected from inoculated samples after incubation for 0, 3, 6, 12, 24 and 48 h (A); 12, 24 and 48 h (B); and 48 h (C).

表 2. 白粉病菌 *Podosphaera xanthii* (race 1) 之分生孢子於甜瓜抗感病品種葉圓片上的發芽與菌絲生長。

Table 2. Conidial germination and mycelial growth of *Podosphaera xanthii* (race 1) on leaf-discs of resistant and susceptible varieties of melon[z].

Variety	Conidial germination (%)[y]	Hyphal development rate (%)[x]	Hyphal length ($\mu m\ 48\ h^{-1}$)[w]	Disease severity (%)[v]	Disease reaction
Iran H	55.1 a [u]	41.3 a	196.0 a	100.0 a	Susceptible
Védrantais	51.3 a	44.3 a	204.5 a	100.0 a	Susceptible
PMR-45	15.4 b	0.5 b	67.0 b	0.0 b	Resistant
PI-124112	12.5 b	0.8 b	82.1 b	0.0 b	Resistant
MR-1	15.0 b	0.0 b	0.0 c	0.0 b	Resistant

[z] The data was recorded 48 h after inoculation at 24℃.
[y] Percentage of conidia produced germ tube.
[x] Percentage of germinated conidia developed hyphae from germ tubes .
[w] Mean radial length of mycelia from germ tubes.
[v] Percentage of leaf-disc area of melon showing symptoms of powdery mildew.
[u] Means within each column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ according to the Fisher's least significance difference (LSD) test.

異，其菌絲產生率介於 0–0.3%。菌絲生長長度在 'Iran H' 與 'Védrantais' 處理分別為 174.2 μm 與 181.9 μm，與 'PMR-45'、'PI-414112' 與 'MR-1' 處理間具有顯著差異 ($P < 0.05$)，其菌絲生長長度分別為 63.1、0 與 0 μm。計算發病度，'Iran H' 與 'Védrantais' 處理的發病面積

達95.0與97.2%，但是在 ‘PMR-45’、‘PI-414112’ 與 ‘MR-1’ 處理卻僅有 0–0.2% (表 3)。

不同白粉病菌與甜瓜品種對分生孢子發芽與菌絲生長的影響

甜瓜白粉病菌 *P. xanthii* Px-001 (race 1)、Px-274 (race 1)、Px-359 (race 5) 與 Px-360 (race 5) 等 4 個菌株在 ‘Iran H’ 品種的葉圓片上的孢子發芽率介於 50.0–61.0%，菌絲產生率介於 37.3–54.0%，而菌絲生長長度介於 160.0–229.0 μm，接種後發病度可達 96.7–100.0% 之間。在 ‘PMR-45’ 品種上，供試菌株 Px-001 與 Px-274 的孢子發芽率分別為 17.8–31.5%，與供試菌株 Px-359 與 Px-360 的發芽率分別為 46.0 與 49.8%，具有顯著差異 (P < 0.05)。而 Px-001 與 Px-274 在 ‘PMR-45’ 品種上的菌絲產生率分別為 0.3 與 2.5%，與 Px-359 與 Px-360 的菌絲產生率 29.0 與 32.5%，具有顯著差異 (P < 0.05)。Px-001 與 Px-274 在 ‘PMR-45’ 品種上的菌絲生長長度分別為 21.1 與 87.8 μm，與 Px-359 與 Px-360 的菌絲生長長度 144.4 與 220.8 μm，具有顯著差異 (P < 0.05)。計算發病面積，則 Px-001 與 Px-274 在 ‘PMR-45’ 品種上的發病面積僅為 0 與 5%，與 Px-359 與 Px-360 的發病面積 70 與 73.7%，具有顯著差異 (P < 0.05)。在 ‘MR-1’ 品種上，供試的 4 株菌株孢子發芽率分別為 19.3、22.3、42.3 與 27.3%，以供試菌株 Px-359 處理的孢子發芽率較高，菌絲產生率分別為 2.0、0、1.3 與 6.8%，彼此間無顯著差異 (P < 0.05)，菌絲生長長度分別為 29.3、0、80.4 與 171.7 μm，供試菌株 Px-001 與 Px-274 所得結果與供試菌株 Px-359 與 Px-360 所得結果具有顯著差異 (P < 0.05)。計算發病面積後，發現 4 株供試菌株在 ‘MR-1’ 品種上的發病面積介於 0–2.7%，彼此間無顯著差異 (P < 0.05) (表 4)。

討論

由於甜瓜白粉病菌為絕對寄生菌，故需要在寄主活體上才能獲得生長所需的養分 (Sitterly 1978; Alexopoulos *et al*. 1996)，然而本研究的結果顯示，在無寄主的環境下 (如在高濕度的水瓊脂平板與醋酸纖維玻片上)，甜瓜白粉病菌分生孢子仍可發芽，但在水瓊脂平板上發芽率低，而在醋酸纖維玻片上則發芽率提高，顯示在粗糙接觸面之介質則可能有利於發芽。然而孢子在此 2 介質之發芽率皆較葉片上低，顯示除了高濕度與粗糙接觸面之外，寄主尚有其他因子可促進孢子發芽。在水瓊脂平板與醋酸纖維玻片上，分生孢子雖能發芽產生發芽管，但卻無法長出菌絲，可見分生孢子發芽時外界的養分供應不是絕對需要，但要進一步產生菌絲則需自寄主獲得所需養分。

表 3. 白粉病菌 *Podosphaera xanthii* (race 1) 於盆栽甜瓜抗感病品種葉片上的孢子發芽與菌絲生長。

Table 3. Conidial germination,mycelial growth and disease sevirity of *Podosphaera xanthii* (race 1) inoculated on leaves of susceptible and resistant melon varieties grown in pots[z].

Variety	Conidial germination (%)[y]	Hyphal development rate[x]	Hyphal length (μm 48 h^{-1})[w]	Disease severity (%)[v]	Disease reaction
Iran H	56.3 a [u]	50.8 a	174.2 a	97.2 a	Susceptible
Védrantais	47.6 a	43.8 a	181.9 a	95.0 a	Susceptible
PMR-45	29.4 b	0.3 b	63.1 b	0.2 b	Resistant
PI-124112	21.3 b	0.0 b	0.0 c	0.0 b	Resistant
MR-1	21.9 b	0.0 b	0.0 c	0.0 b	Resistant

[z] The data was recorded 48 h after inoculation at 24℃.
[y] Percentage of conidia produced germ tube.
[x] Percentage of germinated conidia developed hyphae from germ tubes.
[w] Mean radial length of mycelia from germ tubes.
[v] Percentage of leaf-disc area of melon showing symptoms of powdery mildew.
[u] Means within each column followed by the same letter are not significantly different at P < 0.05 according to the Fisher's least significance difference (LSD) test.

表 4. 以塑酯薄膜法測定不同白粉病菌株於甜瓜抗感病品種葉圓片上的孢子發芽與菌絲生長。

Table 4. Conidial germination, mycelial growth and disease severity of different *Podosphaera xanthii* isolates inoculated on leaf-discs of resistant and susceptible melon varieties[z].

Variety	Isolate[y]	Conidial germination (%)[x]	Hyphal development rate (%)[w]	Hyphal length (μm 48 h^{-1})[v]	Disease severity (%)[u]	Disease reaction
Iran H	Px-001	61.0 ab[t]	41.0 b	191.8 abc	100.0 a	Susceptible
	Px-274	49.8 bc	38.3 bc	193.2 abc	100.0 a	Susceptible
	Px-359	50.0 bc	37.3 bc	160.3 cd	96.7 a	Susceptible
	Px-360	58.5 ab	54.0 a	229.0 a	96.7 a	Susceptible
PMR-45	Px-001	17.8 e	2.5 d	87.8 e	0.0 c	Resistant
	Px-274	31.5 de	0.3 d	21.1 f	5.0 c	Resistant
	Px-359	49.8 bc	29.0 c	144.4 d	73.7 b	Susceptible
	Px-360	46.0 c	32.5 bc	220.8 ab	70.0 b	Susceptible
MR-1	Px-001	19.3 e	2.0 d	29.3 f	0.0 c	Resistant
	Px-274	22.3 e	0.0 d	0.0 f	0.0 c	Resistant
	Px-359	42.0 cd	1.3 d	80.4 e	0.0 c	Resistant
	Px-360	27.3 e	6.8 d	171.7 cd	2.7 c	Resistant

[z] The data was recorded 48 h after inoculation at 24℃.
[y] Isolates Px-001 and Px-274 are race 1 and isolates Px-359 and Px-360 are race 5.
[x] Percentage of conidia produced germ tube.
[w] Percentage of germinated conidia developed hyphae from germ tubes.
[v] Mean radial length of mycelia from germ tubes.
[u] Percentage of leaf-disc area of melon showing symptoms of powdery mildew.
[t] Means within each column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ according to the Fisher's least significance difference (LSD) test.

本研究結果顯示，接種於甜瓜葉片上的甜瓜白粉病菌分生孢子發芽適溫是 20–28℃，而菌絲生長之最適溫是 20–26℃。28℃發芽率雖可達 41.3%，但菌絲產生率卻僅有 15.7%，且菌絲長度較短。依據 Huang *et al*. (2006) 的報告，甜瓜白粉病病勢發展最快的溫度是 20–24℃，可見分生孢子發芽之適溫，不見得是病害發生之適溫，而菌絲生長的適溫與病勢發展適溫則較為相近。

過去研究在白粉病抗、感病品種篩選上，常利用自然感染 (Schnathorst 1965; Aust 1986)、人工接種在盆栽植株 (Cohen & Cohen 1986) 或葉圓片 (Kaur & Jhooty 1986; Cohen 1993; Epinet *et al*. 1993; Mohamed *et al*. 1995; Bardin *et al*. 1997)。一般接種後呈現抗、感病反應的判讀時間至少需要 10 d，而由本研究利用塑酯薄膜分析的結果顯示，48 h 即可利用顯微鏡觀察得到孢子的發芽率、菌絲產生率與菌絲生長長度，這些皆與植株表現抗、感病反應有關。發芽率、菌絲產生率高或菌絲生長長度長者，多呈現感病反應，反之則為抗病反應。而且葉圓片接種的反應與盆栽接種的反應相同，顯示在孢子發芽的階段，寄主與病原菌之間即有交互作用，一直持續到菌絲生長。然而在本研究中，有白粉病菌菌系的孢子發芽率或菌絲生長長度在感病與抗病甜瓜品種無顯著差異，如表 4 中的 Px-359 (race 5) 菌株在感病甜瓜品種 ‘PMR-45’ 或抗病品種 ‘MR-1’ 之分生孢子發芽率分別為 49.8% 或 42.0%，二者無顯著差異；Px-360 (race 5) 菌株在抗病品種 ‘MR-1’ 的 48 h 菌絲生長長度達 171.7 μm，已和一般感病反應的菌絲生長長度差不多，所以無法以孢子發芽率與菌絲生長長度做為抗感病反應的早期判斷。然而菌絲產生率與甜瓜品種抗感病反應相符，接種在感病品種之供試菌株菌絲產生率大於 29.0%，在抗病品種則低於 6.8%。故可在接種甜瓜白粉病菌分生孢子 48 h 後，利用塑酯薄膜法於顯微鏡下計算孢子菌絲產生率，作為甜瓜對白粉病菌抗感性的早期判斷。

在利用塑酯薄膜來檢測孢子在葉片上發芽

與菌絲生長的最大優點是方便且快速，不像葉肉透化染色或是掃描式電子顯微鏡的標本處理可能會讓未發芽孢子從葉表面上掉落。筆者曾使用石臘包埋，但耗時費工，且石臘不夠透明而不利觀察。黏附在塑酯薄膜的白粉病菌孢子與菌絲很容易在光學顯微鏡下觀測，不過此方法也有其限制，在接種超過 48 h 以後，菌絲生長密佈的情形下，則不易在顯微鏡下觀察塑酯薄膜上的孢子發芽與否，而附著器 (appresorium) 與吸器 (haustorium) 也不易用此方法觀察。塑酯薄膜法不僅可適用於觀察甜瓜白粉病菌分生孢子在甜瓜葉表上的發芽與菌絲生長，未來應可應用在寄生在寄主表面的其他白粉病菌、其他絕對寄生菌 (如某些銹病菌) 或其他表生真菌。

引用文獻

Alexopoulos, C. J., C. W. Mims, and M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. John Wiley and Sons. New York. 880 pp.

Aust, H. J. 1986. Microclimate in relation to epidemics of powdery mildew. Annu. Rev. Phytopathol. 24:491–510.

Bardin, M., P. C. Nicot, P. Normand, and J. M. Lemaire. 1997. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. Eur. J. Plant Pathol. 103:545–554.

Braun, U., R. T. A. Cook, A. J. Inman, and H. D. Shin. 2002. The taxonomy of the powdery mildew fungi. p.13–55. *in*: The Powdery Mildews–A Comprehensive Treatise. (Belanger, R. R., W. R. Bushnell, A. J. Dik, and T. L. W. Carver, eds.) Amer. Phytopathological Society Press. St. Paul. 292 pp.

Cohen, R. 1993. A leaf disk assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. Plant Dis. 77:513–517.

Cohen, S. and Y. Cohen. 1986. Genetics and nature of resistance to race 2 of *Sphaerotheca fuliginea* in *Cucumis melo* PI 124111. Phytopatholgy 76:1165–1167.

Epinet, C., M. Pitrat, and F. Bertrand. 1993. Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildew. Euphytica 65:135–144.

Huang, J. H. and Y. H. Wang. 2007. The races of *Podosphaera xanthii* caused melon powdery mildew in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 56:307–315. (in Chinese with English abstract)

Huang, J. H., C. T. Lo, and T. F. Hsieh. 2006. Disease assessment of powdery mildew on melon with cultured leaf method. J. Taiwan Agric. Res. 55:91–100. (in Chinese with English abstract)

Huang, J. H., C. W. Chen, and J. F. Su. 2009. Propagation, inoculation and preservation of *Podosphaera xanthii* caused muskmelon powdery mildew. J. Taiwan Agric. Res. 58:176–184. (in Chinese with English abstract)

Huang, J. H., Y. H. Wang, and C. T. Lo. 2002. Development of leaf-disk method for screening melon varieties resistant to *Sphaerotheca fuliginea* race. J. Agric. Res. China 51(4):49–56. (in Chinese with English abstract)

Jahn, M., H. M. Nunger, and J. D. McCreight. 2002. Breeding cucurbit crops for powdery mildew resistance. p.239–248. *in*: The Powdery Mildews- A Comprehensive Treatise. (Belanger, R. R., W. R. Bushnell, A. J. Dik, and T. L. W. Carver, eds.) Amer. Phytopathological Society Press. St. Paul. 292 pp.

Kaur, J. and J. S. Jhooty. 1986. Presence of race 3 of *Sphaerotheca fuliginea* on muskmelon in Punjab. Indian Phytopathol. 39:297–299.

Křístková, E., A. Lebeda, and B. Sedláková. 2007. Temporal and spatial dynamics of powdery mildew species on cucurbits in the Czech Republic. Acta Hortic. 731:337–343.

Kuzuya, M., K. Yashiro, K. Tomita1, and H. Ezura. 2006. Powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) resistance in melon is categorized into two types based on inhibition of the infection processes. J. Exp. Bot. 57:2093–2100.

McCreight, J. D. 2006. Melon-powdery mildew interactions reveal variation in melon cultigens and *Podosphaera xanthii* race 1 and 2. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 131:59–65.

Mohamed, Y. F., M. Bardin, P. C. Nicot, and M. Pitrat, 1995. Causal agents of powdery mildew of cucurbit in Sudan. Plant Dis. 79:634–636.

Pitrat, M., C. Dogimont, and M. Bardin. 1998. Resistance to fungal diseases of foliage in melon. Cucurbitaceae 98:167–173.

Romero, D., M. E. Rivera, F. M. Cazorla, J. C. Codina, D. Fernández-Ortuño, J. A. Torés, A. Pérez-García, and A. de Vicente. 2008. Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell wall reinforcement incompatible and incompatible melon-powdery mildew (*Podosphaera fusca*) interactions. J. Plant Physiol. 165:1895–1905.

Schnathorst, W. C. 1965. Environmental relationships in the powdery mildews. Annu. Rev. Phytopathol. 3:343–363.

Sitterly, W. R. 1978. Powdery mildew of cucurbits. p.359–377. *in*: The Powdery Mildews. (Spencer, D. M., ed.). Academic Press. New York. 565 pp.

Tsay, J. G. and B. K. Tung. 1994. Powdery mildew of cucurbit crops. p.127–144. *in*: the Proceeding of Symposium on Techniques of Cucurbits Protection. Plant Protection Society of ROC Press. Taichung. (in Chinese with English abstract)

Zitter, T. A., D. L. Hopkins, and C. E. Thomas. 1996. Compendium of Cucurbit Disease. APS Press. Paul. 87 pp.

Observation of Conidia Germination and Mycelial Growth of *Podosphaera xanthii* on Melon Leaf by Plastic Membrane Method

Jin-Hsing Huang[1,*] and Jiunn-Feng Su[1]

Abstract

Huang, J. H. and J. F. Su. 2013. Observation of conidia germination and mycelial growth of *Podosphaera xanthii* on melon leaf by plastic membrane method. J. Taiwan Agric. Res. 62(4):340–350.

A study revealed that conidial germination of *Podosphaera xanthii* was observed under light microscope when they were inoculated on water agar, acetyl cellulose or leaf discs of melon and retrieved by a plastic membrane method. However, mycelial growth was observed only by the plastic membrane method. When conidia of *P. xanthii* (race 1) were inoculated on melon leaf-discs (Iran H variety), incubated for 48 h at series temperatures, and prepared specimens with the plastic membrane method for observation under compound microscope, the range of optimum temperature for conidial germination was 20–28℃ with the germination rate of 40.7–48.3%. The range of optimum temperature for hyphal development from germinated conidia and mycelial growth was 20–26℃, with the hyphal development rate of 30.7–33.1% and the hyphal length of 179.0–228.0 μm. When conidia of *P. xanthii* (race 1) were inoculated on leaf-discs of the susceptible melon varieties, 'Iran H' and 'Védrantais', and incubated at 24℃ for 48 h, the range of conidial germination rate, hyphal development rate and hyphal length were 51.3–58.8%, 41.3–53.5% and 196.0–212.4 μm, respectively. They were significantly ($P < 0.05$) higher than those (12.5–15.4%, 0–0.8%, and 0–82.1 μm) of the pathogen inoculated on the resistant melon varieties, 'PMR-45', 'PI-124112' and 'MR-1'. When the conidia of P. xanthii (race 1) were inoculated on leaves of the tested melon varieties grown in pots, the conidial germination, hyphal development rate and hyphal length were similar to the results of conidia inoculation on the leaf-discs. The conidia of race 1 strains (Px-001 and Px-274) and race 5 strains (Px-359 and Px-360) of *P. xanthii* were respectively inoculated on leaf discs of the susceptible variety Iran H and the resistant varieties, 'PMR-45' and 'MR-l', the hyphal development rate (29.0–54.0%) on the susceptible melon varieties was significantly ($P < 0.05$) higher than that (0–6.8%) on the resistant varieties. These results suggest that the plastic membrane method for collecting samples from leaf discs or leaves of plants inoculated with conidia of *P. xanthii* may be a useful and practical method for effective rating of melon varieties for resistance to powdery mildew.

Key words: Plastic membrane method, Melon, *Podosphaera xanthii*, Conidial germination, Mycelial growth.

Received: May 3, 2013; Accepted: September 6, 2013.
[*] Corresponding author, e-mail: jhhuang@ tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.